

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Trabajo Fin de Máster

**Trazabilidad de productos manufacturados:
desarrollo de un método de marcaje
encubierto de perfumes.**

Álvaro Iglesias Vegas

Julio 2012, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Departamento de
Química Física y Analítica

MARIELLA MOLDOVAN FEIER, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS MANUFACTURADOS: DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MARCAJE ENCUBIERTO DE PERFUMES**”, ha sido realizado por Álvaro Iglesias Vegas en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster (2011-12) del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, 18 de Julio de 2012

Fdo.: Mariella Moldovan Feier

Finalizado este Trabajo, desearía expresar mi agradecimiento a aquellas personas que han contribuido a su realización.

En primer lugar a la Dra. Mariella Moldovan por brindar la oportunidad de realizarlo.

A Aida Reguera por toda la ayuda ofrecida, así como por su paciencia y sus consejos.

Y a mi familia por su apoyo y confianza incondicional.

Índice

1.- INTRODUCCIÓN	1
• Los Perfumes.....	2
• Técnicas analíticas de análisis.....	3
• Necesidad de métodos de marcaje.....	3
• Marcaje isotópico.....	5
• Medida relaciones isotópicas.....	7
• Equipo ICP-MS.....	7
• Interferencias.....	9
• Otros usos del marcaje.....	10
2.- OBJETIVO.....	11
3.- EXPERIMENTAL.....	13
• Materiales y Reactivos.....	14
• Muestras.....	15
• Instrumentación.....	15
• Procedimientos.....	16
4.- RESULTADOS.....	18
• Tratamiento de la muestra.....	19
- Estudios de Recuperación.....	21
• Estudios previos.....	23
• Selección del marcador.....	24
• Optimización de la concentración.....	25
• Optimización de la relación isotópica.....	27
• Marcaje de perfumes originales.....	28
5.- CONCLUSIONES.....	30
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	35

1.- Introducción

1.1. Los Perfumes

Los perfumes y las colonias pertenecen al extenso grupo de los productos cosméticos, productos abundantes y cotidianos en nuestra sociedad moderna. Pese a lo amplio del concepto “cosméticos” todos los productos que en él se engloban pueden definirse como sustancias o mezcla de sustancia cuyo objetivo es su aplicación o contacto sobre partes del cuerpo con la finalidad de proteger, limpiar, perfumar y/o cambiar de apariencia.

Aunque pueda parecer lo contrario algunos de estos productos y en especial los perfumes se vienen empleando desde muy antiguo. Si bien, su finalidad se ha visto modificada a lo largo del tiempo: desde su uso en ritos religiosos en las sociedades antiguas, a elemento de higiene en la Edad Media hasta su uso actual como objeto de lujo y moda.

Del mismo modo que su utilidad, su composición tampoco se ha mantenido constante. Los perfumes originales, inicialmente elaborados a partir de extractos vegetales y animales, en el siglo XIX comenzaron a ser sustituidos por otros que contenían materiales sintéticos (1868, *uso de Cumarinas por Houbinat*), que potenciaban los aromas naturales. Incluso a principios del siglo XX aparecieron ya perfumes mayoritariamente sintéticos (1921, *Chanel*), en los que los componentes naturales quedan relegados a suavizar los artificiales, por otro lado más baratos y accesibles.

Como mucho otros productos en la actualidad (medicinas, ropa, juguetes, repuestos de coche...) los perfumes, y los cosméticos en general, no se han librado de la imitación y la falsificación estando estos fenómenos presentes prácticamente desde sus primeras comercializaciones (1709, *Eau de Cologne, por Gian Paolo Feminis*).



Desde entonces las falsificaciones no han hecho sino aumentar. La aparición de perfumes sintéticos más baratos de fabricar, la comercialización en masa por todo el mundo, el desarrollo de las técnicas analíticas, y, finalmente, las transacciones vía Internet ha supuesto una mayor accesibilidad y difusión de los productos originales, pero también una mayor extensión y calidad de las falsificaciones.

1.2. Técnicas analíticas de análisis

El número de técnicas convencionales para el análisis de perfumes era inicialmente limitado, y estaba relacionado con el contenido volátil. Sin embargo en las últimas décadas el número de técnicas disponibles para el análisis de esa fracción volátil se ha incrementado considerablemente con la aparición de nuevas técnicas de extracción más selectivas, inertes, suaves, rápidas y técnicas de análisis de mayor velocidad y resolución tal como se resumen en la Tabla 1. [1,2]

Técnicas de Preparación de Muestra	Técnica de Análisis
Destilación	GC
SDE	GC-Capilar
Extracción Off-Line	GC-MS
Head-Space	GC-FT-IR
SFE (supercritical fluid extraction)	GC-high speed
ASE (accelerated solvent extraction)	Tof-MS
MAE (microwave-assisted extraction)	GCXGC
	GC-IR-MS (Isotope Ratio)
	ES-MS

Tabla 1. Técnicas analíticas de extracción y análisis de perfumes convencionales

Dentro de la bibliografía se describen otras técnicas como la “Sonic Spray Ionization” (SSI) [3], la “Electrospray Ionization Mass Spectrometry” (ESI-MS) [4] o la “Extractive Electrospray Ionization Mass Spectrometry” (EESI-MS) [5]. Actualmente, una técnica novedosa es en la olfacción electrónica [6], un dispositivo comercial que de una forma rápida detecta la autenticidad de un perfume.

1.3. Necesidad del marcaje

En las últimas décadas el aumento de productos falsificados, ha experimentado un continuo incremento. El menor precio de estos productos, por otro lado de peor calidad y hasta potencialmente peligrosos (ejemplo máximo los medicamentos) ha sido un factor determinante en su proliferación. Desde utensilios de decoración hasta relojes y prendas de marca o repuestos de automóviles, las falsificaciones se han extendido sobre todos los sectores sin excepción.

Obviamente todos los productos originales se encuentran protegidos frente a estos fraudes por las legislaciones de los diferentes países en los que se producen y/o comercializan, mostrando distintivos como el sello de calidad *CE* en la Unión Europea. Otras formas de marcaje empleadas se encuentran en el uso de códigos, marcas de agua, etiquetados láser, y finalmente en el diseño o uso de materiales de difícil imitación. Aún así, en muchas ocasiones estos métodos de marcaje no son suficientes, y los productos falsificados llegan a integrarse entre los originales. Este hecho conlleva la aparición de ciertos efectos negativos que se presentan a continuación.

1.3.1. Legislación y Seguridad

Los productos cosméticos, como mezcla de sustancias químicas a las que el cuerpo está directamente expuesto pueden entrañar riesgos para la salud. Como ejemplo los cosméticos antiguos que poseían plomo, elemento posteriormente considerado tóxico, contaminante y origen de la plumbosis o saturnismo (intoxicación por plomo). En este sentido, otros componentes podrían desarrollar también reacciones adversas tales como alergias, sensibilizaciones [7,8], quemaduras y otros trastornos ya sea por su sola presencia o por ciertos niveles de concentración.

Ante este potencial problema, para la protección de los consumidores garantizando la seguridad de los productos cosméticos, ya en 1976 la legislación europea definió una normativa de regulación para estos productos [9]. Dicha normativa ha sido con los años sometida a numerosas actualizaciones (tabla 2) y, de hecho, será nuevamente actualizada en el año 2013 [10]. Esta directiva se compone de un conjunto de tablas en las que se recogen aquellos componentes cuyo uso está prohibido en los cosméticos, aquéllos que poseen límites de concentración, los que poseen otras restricciones y, por omisión, aquéllos permitidos.

Legislación original	Prohibiciones	Modificación	Prohibiciones
C.D. 76/768/EEC - 1976	Arsénico Antimonio Berilio Cadmio Teluro Bromo Iodo Cloro	C.D. 83/191/EEC - 1983	Sales Berilio Sales Bario
		C.D. 85/391/EEC - 1985	Selenio
		C.D. 86/199/EEC - 1986	Mercurio
		C.D. 2000/11/EC - 2001	Zirconio
		C.D. 2004/93/EC - 2004	Plomo

Tabla 2. Ejemplos de algunas modificaciones realizadas.

De forma obvia cabe pensar que aquellos productos surgidos de la imitación o falsificación no pasan los controles necesarios que garantizan su seguridad. Por tanto su composición puede situarse al margen de la legislación, pudiendo conllevar de problemas de salud como alergias, quemaduras, erupciones y demás trastornos cutáneos, procesos, que debido a la variedad de las rutas de sensibilización, son impredecibles y difíciles de controlar.

1.3.2. Daños Económicos

Según la Cámara de Comercio Internacional, entre el 5 y 7% del comercio mundial corresponde a productos falsificados (datos año 2001) [11,12]. Es pues, la pérdida en volumen de negocio, el mayor problema económico asociado al comercio de falsificaciones. Pero no es el único. La industria cosmética ha de invertir en la protección sus productos contra el fraude, en la forma de diseños, juicios y litigaciones, inversiones en investigación y desarrollo de nuevas fórmulas.

Menores beneficios y un aumento del gasto pueden revertir contra la población a través de subida de precios y reducción de la oferta. También, en un caso extremo, puede afectar a la más la población activa que encuentra trabajo en este sector, y que no solo engloba las grandes marcas cosméticas sino también a las empresas asociadas como las de transporte, distribución o publicidad.

Las falsificaciones además no dejan de ser el producto de una actividad ilegal, que incurre en delitos como robo de identidad, venta ilegal, explotación de trabajadores y colaboración o integración en organizaciones criminales mostrando nexos con otras actividades ilegales.

1.4. Marcaje isotópico

En un intento por frenar el avance de los productos falsificados, nuevos métodos de marcaje que permitan la autenticación de un producto están siendo desarrollados.

El marcaje isotópico es una forma de marcaje encubierto. Este tipo de marcaje implica la adición de un isótopo estable al producto dando lugar una marca, la cual, tan solo puede ser detectada mediante análisis químicos. Éste hecho permite mayor funcionalidad del marcaje dado que se dificulta enormemente la falsificación frente a los marcajes tradicionales.

Ejemplos de esta modalidad de marcaje encubierto se encuentran en las patentes de R.P. Welle [13] y J.P. Frideling [14]. En la primera se describe un proceso de marcaje basado en la

adición de una marca que contiene dos elementos diferentes, en tanto que la segunda utiliza compuestos orgánicos enriquecidos en isótopos H (^2H), C (^{13}C), O (^{18}O) y N (^{15}N) para el marcaje de productos. Estas primeras patentes presentaban la desventaja de no ser capaces de corregir la presencia natural del elemento trazador en los objetos.

A continuación se procede a una descripción más detallada del marcaje isotópico propuesto y empleado a lo largo del presente Trabajo Fin de Máster:

La metodología analítica empleada se basa en la adición al producto manufacturado de una mezcla de, al menos, dos isótopos estables enriquecidos de un mismo elemento ya presente en el producto de manera natural. La medida de la relación de fracciones molares entre los perfiles isotópicos presentes en el producto manufacturado mediante ICP-MS permitirá su identificación inequívoca incluso en presencia de una elevada y variable cantidad del mismo elemento de perfil isotópico natural en el producto.

A continuación, se incluye una breve descripción de la metodología a seguir en el análisis de los productos marcados así como una serie de definiciones que permitan comprender la metodología utilizada [15]:

Definiciones:

- **Perfil isotópico:** Se define como el conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un elemento. La suma de todas las abundancias isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico es 1 (ó 100% si se utilizan las abundancias expresadas en átomos por ciento). El perfil isotópico de un elemento puede medirse experimentalmente mediante, por ejemplo, la Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).
- **Perfil isotópico natural:** Es el perfil isotópico de un elemento que se encuentra en la naturaleza. Para la mayoría de los elementos de la Tabla Periódica el perfil isotópico natural es constante e invariable en toda la Tierra. Las abundancias isotópicas naturales de los elementos están tabuladas incluyendo sus incertidumbres.
- **Perfil isotópico alterado:** Es el perfil isotópico de un elemento donde la abundancia relativa de uno o varios isótopos estables de dicho elemento es claramente distinta de la natural. En estos perfiles isotópicos alterados normalmente un isótopo se encuentra en una abundancia isotópica relativa más elevada que en el elemento natural, isótopo enriquecido, mientras que el resto de isótopos tienen una abundancia menor.

- Fracción molar de un perfil isotópico: Se define como la cantidad de moles correspondiente a un determinado perfil isotópico de un elemento dividida por la cantidad de moles totales de ese mismo elemento en la muestra analizada.
- Deconvolución de perfiles isotópicos: Es el proceso matemático basado en la regresión lineal múltiple por el cual se calcula la contribución de varios perfiles isotópicos distintos de un mismo elemento al perfil isotópico medido experimentalmente para ese elemento en la muestra. El resultado de este proceso matemático es la fracción molar de cada uno de los perfiles isotópicos en la muestra.

Fundamento:

Para la identificación del producto marcado se toma una muestra del mismo y se determina el perfil isotópico de este elemento en el producto mediante Espectrometría de Masas. El perfil isotópico medido en el producto se descompone en, al menos, tres componentes mediante la deconvolución de perfiles isotópicos: la fracción molar del elemento de abundancia isotópica natural y las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos alterados añadidos al producto. La relación de fracciones molares entre cada uno de los perfiles isotópicos alterados añadidos al producto será igual a la relación de fracciones molares en el trazador, dentro de la incertidumbre experimental de la medida, e independiente de la fracción molar medida para el perfil isotópico natural del elemento.

Ejemplo para dos perfiles isotópicos alterados $p1$ y $p2$:

Dado que el producto a marcar puede contener una cantidad variable y desconocida del mismo elemento de abundancia isotópica natural, el número de moles totales del elemento en el producto marcado, N_m , vendrá dado por:

$$N_m = N_{nat} + N_{p1} + N_{p2} \quad [1]$$

Donde N_{nat} es el número de moles desconocidos del elemento de abundancia isotópica natural y N_{p1} y N_{p2} son los moles del elemento correspondientes a los dos perfiles isotópicos alterados añadidos al producto.

El balance de masas de la ecuación [1] puede hacerse también para todos y cada uno de los isótopos del elemento que configuran su perfil isotópico. Por ejemplo, para un isótopo cualquiera i el balance de masas sería:

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{p1}^i + N_{p2}^i \quad [2]$$

La ecuación [2] se puede expresar como una combinación lineal de la cantidad total del elemento en cada uno de los perfiles isotópicos y de las abundancias isotópicas conocidas o medidas de cada perfil según:

$$N_m \cdot A_m^i = N_{nat} \times A_{nat}^i + N_{p1} \times A_{p1}^i + N_{p2} \times A_{p2}^i \quad [3]$$

donde A_m^i , A_{nat}^i , A_{p1}^i y A_{p2}^i son las abundancias isotópicas del isótopo i en cada uno de los perfiles isotópicos considerados. Si se divide la ecuación [3] entre la ecuación [1] se obtiene la siguiente expresión matemática:

$$A_m^i = x_{nat} \times A_{nat}^i + x_{p1} \times A_{p1}^i + x_{p2} \times A_{p2}^i \quad [4]$$

donde:

$$x_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{p1} + N_{p2}}, \quad x_{p1} = \frac{N_{p1}}{N_{nat} + N_{p1} + N_{p2}} \quad \text{y} \quad x_{p2} = \frac{N_{p2}}{N_{nat} + N_{p1} + N_{p2}}$$

son las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos x_{nat} , x_{p1} y x_{p2} que contribuyen al perfil isotópico observado en la muestra.

El elemento utilizado como marca debe poseer al menos 3 isótopos estables para poder establecer al menos tres ecuaciones con tres incógnitas. Sea n en número de isótopos estables del elemento utilizado. Entonces se puede definir una ecuación de abundancias isotópicas y

fracciones molares (ecuación [4]) para cada isótopo. Esa serie de ecuaciones se puede expresar, en notación matricial, como:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{p1}^1 & A_{p2}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{p1}^2 & A_{p2}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{p1}^3 & A_{p2}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{p1}^{n-1} & A_{p2}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{p1}^n & A_{p2}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{p1} \\ x_{p2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [5]$$

En el caso de que $n > 3$ existen más ecuaciones que incógnitas (fracciones molares) y se ha de incluir un vector de error en la ecuación [5]. Los valores de las incógnitas x_{nat} , x_{p1} y x_{p2} se obtienen mediante regresión lineal múltiple. Una vez determinados los valores de las fracciones molares x_{nat} , x_{p1} y x_{p2} y sus incertidumbres en la muestra se calcula la relación x_{p1}/x_{p2} que coincide con la relación de moles N_{p1}/N_{p2} añadidos al producto a marcar. Esta relación es independiente del valor absoluto de la fracción molar del elemento de perfil isotópico natural en la muestra, x_{nat} , y, por tanto, no está afectada por la concentración del elemento natural, sea ésta constante o variable.

1.5. Medida de relaciones isotópicas con ICP-MS

Desde su aparición en los años ochenta, la espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) no ha hecho más que ganar importancia en los laboratorios de todo el mundo. Características como su elevada sensibilidad, en el rango de las ppt (ng/g), la posibilidad de realizar análisis isotópicos, la elevada productividad y el rango de trabajo de hasta seis órdenes de magnitud ha permitido que esta técnica se haga un hueco en el panorama del análisis elemental, dominado por otras técnicas como Absorción Atómica o ICP-OES. Estas propiedades hacen del ICP-MS de una técnica apropiada para la determinación de elementos a nivel de trazas en variedad de muestras, así como la medida de relaciones isotópicas, sustituyendo a la atomización e ionización térmicas de resultados precisos pero de largo tiempo de análisis.

1.6. ICP-MS

Para tener una visión del funcionamiento de este equipo se describen a continuación sus principales componentes y su función.

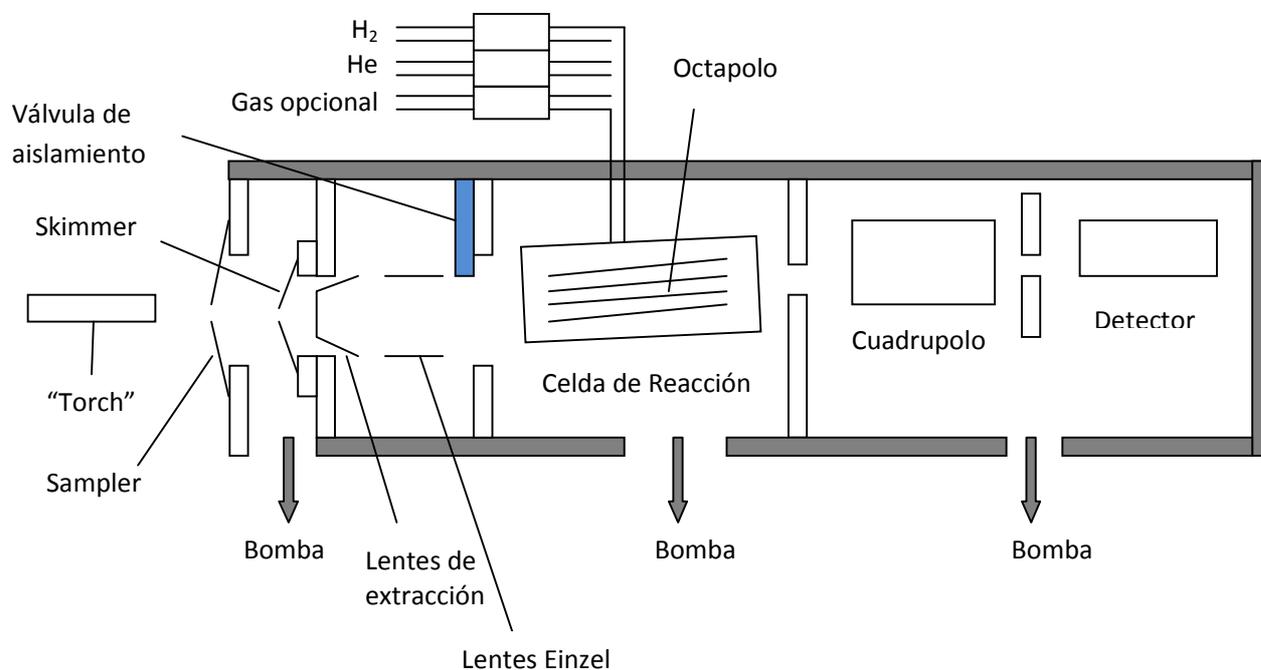


Figura 1. Esquema del equipo ICP-MS Agilent 7500ce ORS.

Sistema de Introducción de muestra: la muestra, normalmente en estado líquido, es aspirada mediante la acción de una bomba peristáltica hacia una cámara de nebulización. En ella se forma un aerosol (líquido formado por partículas muy finas) que es posteriormente transportado hacia el sistema de ionización por una gas portador, generalmente Argón. Dependiendo de la viscosidad, limpieza y hasta del volumen disponible de muestra los nebulizadores más empleados son los concéntricos, los cross-flow y los babington.

Antorcha ICP: consta de tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluye gas Argón. El flujo de Argón aportado desde el tubo más externo tiene como objetivo enfriar las paredes de la antorcha. Por el canal del medio entra un flujo auxiliar de Argón, que sirve para la estabilización del plasma. Y finalmente por el tubo más interno se aporta la muestra nebulizada arrastrada por el gas portador (Ar). Una vez en el plasma la muestra sufre deshidratación, vaporización, atomización e ionización, generándose tras estos procesos iones monopositivos. La formación de estos iones está afectada por parámetros como la

temperatura del plasma, la densidad electrónica y obviamente por los potenciales de ionización de cada elemento.

Sistema de Ionización: un gas (o una mezcla de ellos) generan ,a presión atmosférica, un plasma, altamente ionizado, conductor de la electricidad y de 6000-8000K.

Espectrómetro de Masas: los analizadores de masas más habituales son el de doble enfoque (sector magnético), el de tiempo de vuelo (ToF) y sobre todo el cuadrupolo. Éste último está formado por cuatro barras paralelas y cilíndricas, sometidas, dos a dos, a potenciales de corriente continua y radiofrecuencias. La variación de los voltajes aplicados a dichas barras consigue filtrar los iones de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) de forma que solo determinados iones mantienen una trayectoria estable a lo largo de cuadrupolo y llegan hasta el detector. Esto potenciales se cambian rápidamente con el objeto de poder cubrir todo el espectro de masas.

Detector: Los iones provenientes del cuadrupolo golpean una superficie activa para generar una señal eléctrica medible. Esta superficie recibe el nombre de dínodo y al colisionar con los iones generan electrones. Estos electrones son acelerados hacia otros dínodos secundarios situados a potenciales más positivos, en los cuales se generan por colisiones otros electrones (electrones secundarios). Este proceso se repite varias veces (hasta más de 20) en la llamada cascada de electrones hasta que se consigue la intensidad necesaria para ser registrada con un pulso. Al contar el número de pulsos el sistema calcula el número de iones que llegaron al primer dínodo. La detección puede en este punto realizarse de dos forma diferentes, o bien contando el número de pulsos (modo digital) o contando el número de iones (analógico), siendo mejor el primero porque. Los detectores que se rigen por este proceso reciben el nombre de multiplicadores de electrones secundarios (SEM), aunque es cierto que también existen otros como los tubos fotomultiplicadores.

Interfase: el paso de los iones desde el plasma de ionización que se encuentra a más de 6000K y a presión atmosférica hasta el analizador de masas que se haya a temperatura ambiente y a alto vacío (10^{-5} torr.) es una etapa crucial en los equipos ICP-MS. Este paso se consigue a través de dos conos sucesivos de Ni y Pt que tienen orificios milimétricos para el paso de los iones generados en el plasma. Estos iones son inicialmente extraídos por el primer cono, o cono de muestreo (sampler) hasta una región intermedia con una presión entre 1 y 3 torr. Por la acción una bomba de vacío bomba rotatoria de vacío de alta capacidad. Es en esta etapa donde además se eliminan la mayoría de los iones Ar^+ . El haz de iones es a continuación extraído a través del segundo cono o cono de análisis (skimmer), que tiene un orificio de mm

para enfocar el haz hacia el analizador de masas, la cual se mantiene a una presión de 10^{-5} torr. con la acción de una bomba turbomolecular de vacío.

Celda de colisión o reacción: situada antes del espectrómetro de masas, la celda de colisión sirve para la eliminación de interferencias que pueden afectar al límite de detección.

Ordenador: permite el control de varios componentes del instrumento como la generación de RF aplicados a la antorcha, los diferentes flujos de Ar, el analizador de masas, el detector, el sistema de vacío o la bomba peristáltica.

1.7. Interferencias de matriz y espectrales

Aunque las interferencias de matriz no suelen afectar a las medidas de relaciones isotópicas, ya que todos los isótopos de un mismo elemento sufren las interferencias en la misma medida, en el caso de los perfumes, el elevado contenido en alcohol sí que puede tener efectos negativos a modo de supresiones o activaciones en la ionización de determinados elementos. Diferencias en viscosidad entre los perfumes y el disolvente derivadas de ese contenido alcohólico puede provocar inestabilidades en el plasma y problemas en el sistema de introducción de muestra.

Por otro lado existen interferencias espectrales, aquellas derivadas del aumento/disminución de la intensidad en la señal de determinados elementos por solapamiento con isótopos pertenecientes a otra especie química (interferencias isobáricas) o por especies resultantes de combinaciones de elementos presentes en la matriz de la muestra con los gases utilizados por el ICP (interferencias poliatómicas). Puesto que estas interferencias no tienen la misma magnitud en todos los isótopos medidos de una especie, si se detectan han de ser corregidas.

1.8. Otros usos de la medida de relaciones isotópicas.

A parte de su uso en métodos de marcaje de productos [16] u organismos [17] también se encuentra en aplicaciones como la datación geológica, estudios biológicos [18], estudios de contaminación y en la determinación del origen de productos [19].

2.- Objetivos

Se ha marcado como objetivo de este trabajo el desarrollo de un método de marcaje de productos perfumes que consiste en la adición de una doble marca isotópica.

La medida de las relaciones isotópicas se realiza por ICP-MS usando la deconvolución de perfiles isotópicos como herramienta para detectar la presencia de la marca introducida en las muestras.

Los pasos planteados son en la realización de este trabajo son:

1. Optimización del tratamiento de muestra.
2. Estudio previo sobre la composición metálica de los perfumes.
3. Optimización de la concentración de trazador.
4. Optimización de relación isotópica a utilizar.
5. Marcaje y medida de perfumes originales.

3.- Experimental

3.1. Materiales y Reactivos

Puesto que se trabajará con concentraciones a nivel de ppb (partes por billón), cualquier tipo de contaminación puede alterar los resultados. Por ello todo el material ha de ser previamente lavado por el siguiente procedimiento.

- Lavado con HCl 10% (24 horas).
- Aclarado con agua Milli-Q

Estos dos pasos iniciales solo son necesarios en el caso de usar material reutilizado. Para material nuevo el procedimiento comienza con las etapas siguientes.

- Lavado en baño de HNO₃ 10% (24 horas).
- Aclarado con agua Milli-Q.
- Lavado con HNO₃ sub-boiling 2% (24 horas).
- Aclarado con agua Milli-Q.
- Lavado bajo agua Milli-Q (24 horas).
- Secado del material con estufa durante 24 horas.
- Guardado en bolsas de cierre hermético para evitar contaminaciones.

El agua milli-Q es obtenido por un sistema de purificación de agua Milli-Q modelo plus 185 (Millipore, Molsheim, Francia).

El ácido nítrico grado analítico es purificado por un sistema de destilación lenta a baja temperatura (50^oc) que recibe el nombre de destilación sub-boiling. Requiere de un dispositivo de perfluoroalcoxi (PFA) de Savillex (Savillex, Minnetonka, EEUU) y una lámpara de infrarrojo.

Los isótopos enriquecidos elegidos, ⁹⁵Mo (90%) y ⁹⁷Mo (99%), fueron suministrados por (España), en forma de disoluciones de 2000ppm.

Para el estudio de recuperación se utilizará una mezcla de Isocal 40 e Isocal 41, disoluciones de:

Isocal 40: Au, B, Ge, Mo, Pt, Sb, Sn, Ta, Ti y Zr.

Isocal 41: Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr(III), Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, V y Zn.

Las muestras fueron almacenadas en sus frascos originales, sin embargo para realizar las disoluciones necesarias, pequeñas cantidades fueron traspasadas a viales de vidrio y guardados en nevera.

3.2. Muestras

Originales	Imitaciones
Chanel N°5	Yuven Beauty
	Saphir Laboratorios
Eau de Rochas	Yuven Beauty
	Saphir Laboratorios

Tabla 3. Muestras utilizadas en el estudio

Para las distintas optimizaciones necesarias en el desarrollo del método de marcaje se utilizaron las cuatro muestras de perfume de imitación, adquiridos en comercios cercanos a la Facultad de Química

Una vez desarrollado el método, éste será aplicado a las muestras originales.

3.3. Instrumentación

Equipo ICP-MS

A lo largo del estudio se utilizó como equipo de medida un ICP-MS de cuadrupolo (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con celda de colisión de tipo octapolo (ORS), aunque no utilizada en el presente trabajo. En este equipo la muestra es aspirada con la ayuda de una bomba peristáltica hasta un nebulizador concéntrico (de tipo Meinhard). La cámara de nebulización utilizada (de tipo Scott) se mantiene a 2°C, y la antorcha (tipo Fassel) está equipada con un shield Torch. La interfase de extracción está formada por dos conos de níquel que reciben los nombres de cono de muestreo (Sampler) y cono de separación (Skimmer). Poseen un diámetro de 1 y 0.4mm respectivamente. El analizador de masas es de tipo cuadrupolar. La celda de colisión se encuentra situada entre el sistema de lentes y el analizador, y puede presurizarse con Hidrógeno, Helio, Xenón, o mezclas de dos de ellos.

Finalmente el detector es un multiplicador de electrones secundarios (SEM), pudiendo actuar tanto en modo analógico como en digital.

Otros

Las pesadas se efectuaron en una balanza de precisión Mettler Toledo AB 104 (Barcelona, España).

La etapa de lixiviación, en la preparación de la muestra, utilizó un baño de ultrasonidos Selecta (Barcelona, España).

3.4. Procedimientos

El proceso del marcaje isotópico no es muy complejo y se puede resumir en las siguientes etapas.

- Preparación del Spike por mezcla de dos perfiles isotópicos modificados diferentes. Patrones enriquecidos del trazador.
- Marcaje de la muestra.
- Preparación de la muestra.
- Medida de las relaciones isotópicas por ICP-MS tanto en la muestra como en el trazador.
- Tratamientos matemáticos para el cálculo de las fracciones molares de los perfiles isotópicos que conforman el spike para el cálculo de la relación isotópica.
- Identificación del producto marcado por comparación de la relación isotópica medida en la muestra y la medida en el trazador.

El spike se prepara directamente a partir de las disoluciones comerciales de molibdeno enriquecido. Para preparar 10mL de 120 ppm Mo en agua Milli-Q se muestran en la tabla 4 las cantidades necesarias.

Relación $^{97}\text{Mo}/^{95}\text{Mo}$	^{97}Mo (μL)	^{95}Mo (μL)
1:1	297	732
1:3	148.3	1097
3:1	445	365.9

Tabla 4. Cantidades necesarias (μL) para preparar los spikes a partir de disoluciones enriquecidas de ^{97}Mo y ^{95}Mo 2000ppm

Para el marcaje de la muestra se toma una pequeña porción de la misma (2 mL), sobre la que se añade el spike. En ocasiones las cantidades a tomar, en el rango de los μL , son demasiado pequeñas como para ser medidas sin error. Ante estas situaciones es preferible la realización de sucesivas diluciones del spike inicial.

La muestra una vez marcada se prepara de acuerdo al método de preparación de muestra más adecuado.

Para la obtención de los datos experimentales necesarios para la elaboración de este trabajo se emplea el equipo ICP-MS anteriormente descrito. Se utilizará en modo semicuantitativo y de medida de relaciones isotópicas. En la tabla 5 se muestra los parámetros utilizados en el equipo en la generación de las medidas.

Parámetros	Método	
	Semicuantitativo	Relación isotópica
Potencia (W)	1500	
Flujo de portador (L/min)	1.10	
Velocidad bomba peristáltica (rps)	0.1	
S/C Temperatura	2°C	
Cell Exit (V)	-56	
QP Focus (V)	0	
Oct. Bias (V)	-6	
QP Bias (V)	-3	
Tiempo de integración (s)	0.2s	
Puntos por pico	3	
Réplicas	1	5

Tabla 5. Parámetros del equipo ICP-MS 7500 ce.

4.- Resultados y Tratamiento de datos

4.1. Optimización del tratamiento de muestra

Los perfumes son un tipo de muestras muy complejas, que pueden estar formados por hasta cientos de compuestos orgánicos diferentes, disueltos en alcohol. Ante escasez de información en la bibliografía acerca de la preparación de perfumes para el análisis mediante ICP-MS y en consideración del elevado contenido alcohólico de este tipo de muestras (hasta 85%) se recurrió como fuente de información a las bebidas alcohólicas, principalmente aquellas de alta graduación. El análisis de este tipo de bebidas por ICP-MS si está bastante extendido en la bibliografía, para el estudio de posibles fraudes [20], determinar procedencia [21] o determinar elementos traza contaminantes [22]. De modo que varios tratamientos de muestra posibles fueron propuestos [23].

- Dilución con agua Milli-Q
- Dilución con HNO₃ 1% [24]
- Dilución con HNO₃ 1% - HCl 0.5% [25]
- Evaporación + Reconstitución [26]
- Mineralización [27]
- Radiación UV [28]
- Deshidratación criogénica [29]
- Microondas [27, 28]

En este trabajo se decantó por el tratamiento de muestra más habitual, la dilución. Se aconseja una dilución hasta una concentración de alcohol inferior al 5% [24], para eliminar interferencias de matriz que conlleven atenuaciones o magnificaciones de ciertos elementos debidas a desestabilizaciones del plasma o problemas en el sistema de introducción de muestra [29,30]. Por este motivo las diluciones preparadas se recogen en la tabla 6.

Dilución	Contenido alcohólico (%)	Muestra
1:2000	0.04	Rochas Yuven Beauty
1:1000	0.08	
1:500	0.17	
1:200	0.42	
1:100	0.85	
1:20	4.25	
1:10	8.5	

Tabla 6 Diluciones preparadas y su contenido en alcohol.

Los resultados obtenidos para una muestra de Eau de Rochas imitación de Yjuven Beauty (figura 2) mostraron una ausencia casi total de elementos metálicos en el rango de interés (Fe-Ur) a excepción de unos pocos aún así con intensidades bajas: Hierro, Iodo, Bario, Estroncio, Zinc.

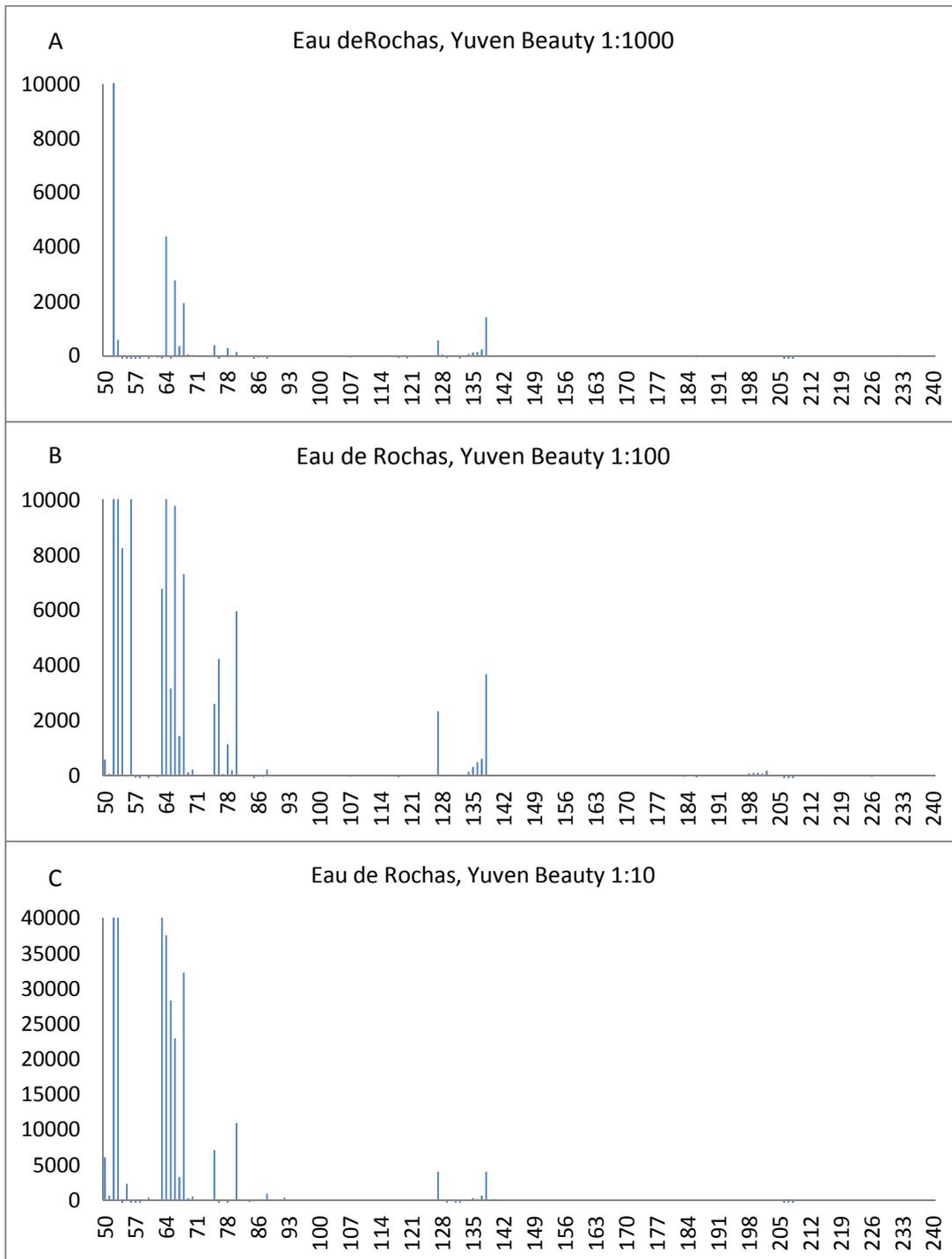


Fig. 2 Espectro de Masas de Eau de Rochas imitación de Yjuven Beauty en dilución (A) 1:1000, (B) 1:100 y (C) 1:10.

Puesto que diluciones muy pequeñas presentan elevado contenido alcohólico y diluciones muy grandes pueden disminuir considerablemente la señal de los posibles metales presentes, se seleccionaron las diluciones intermedias 1:500, 1:200, 1:100 y 1:20 como las más adecuadas para la preparación de la muestra.

En un segundo tratamiento seleccionado, las diluciones anteriormente optimizadas fueron repetidas con una mezcla ácida de HNO₃ (1%) y HCl (0.5%) y con una etapa final de ultrasonidos de 15 minutos, siendo los resultados coincidentes con los ya mostrados.

Finalmente se procedió a un tercer tratamiento de muestra. El perfume sin diluir fue sometido a un proceso de evaporación bajo corriente de N₂ en un baño de agua a 80^oc, seguido de una reconstitución del residuo en HNO₃ 1% y una etapa de lixiviación en ultrasonidos. Los resultados se mantuvieron en consonancia con los ya obtenidos.

Atendiendo a estos tres tratamientos realizados se decidió que el coste de tiempo y preparación necesarios para la evaporación y reconstitución, así como el uso de una mezcla de ácidos no aportaban mejoras a los tratamientos por dilución discutidos en primer lugar. Aún así antes de seleccionar el tratamiento definitivo se procedió a realizar un estudio de recuperación que será tratado en el siguiente apartado.

4.1.1. Estudio de recuperación

Para comprobar si la recuperación de los elementos es la adecuada se propuso este estudio de recuperación. Para ello una muestra de Eau de Rochas y otra de Chanel pertenecientes a la imitación Yuen Beuty fueron dopadas con isocal, y preparadas de acuerdo a las diluciones optimizadas en el apartado anterior (tabla 7).

Muestras		Dilución
Chanel Yuen Beauty	Chanel Yuen Beauty Dopada con Isocal	1:500
		1:200
		1:100
Rochas Yuen Beuty	Rochas Yuen Beuty Dopada con Isocal	1:500
		1:200
		1:100

Tabla 7. Muestras y diluciones utilizadas en el estudio de recuperación.

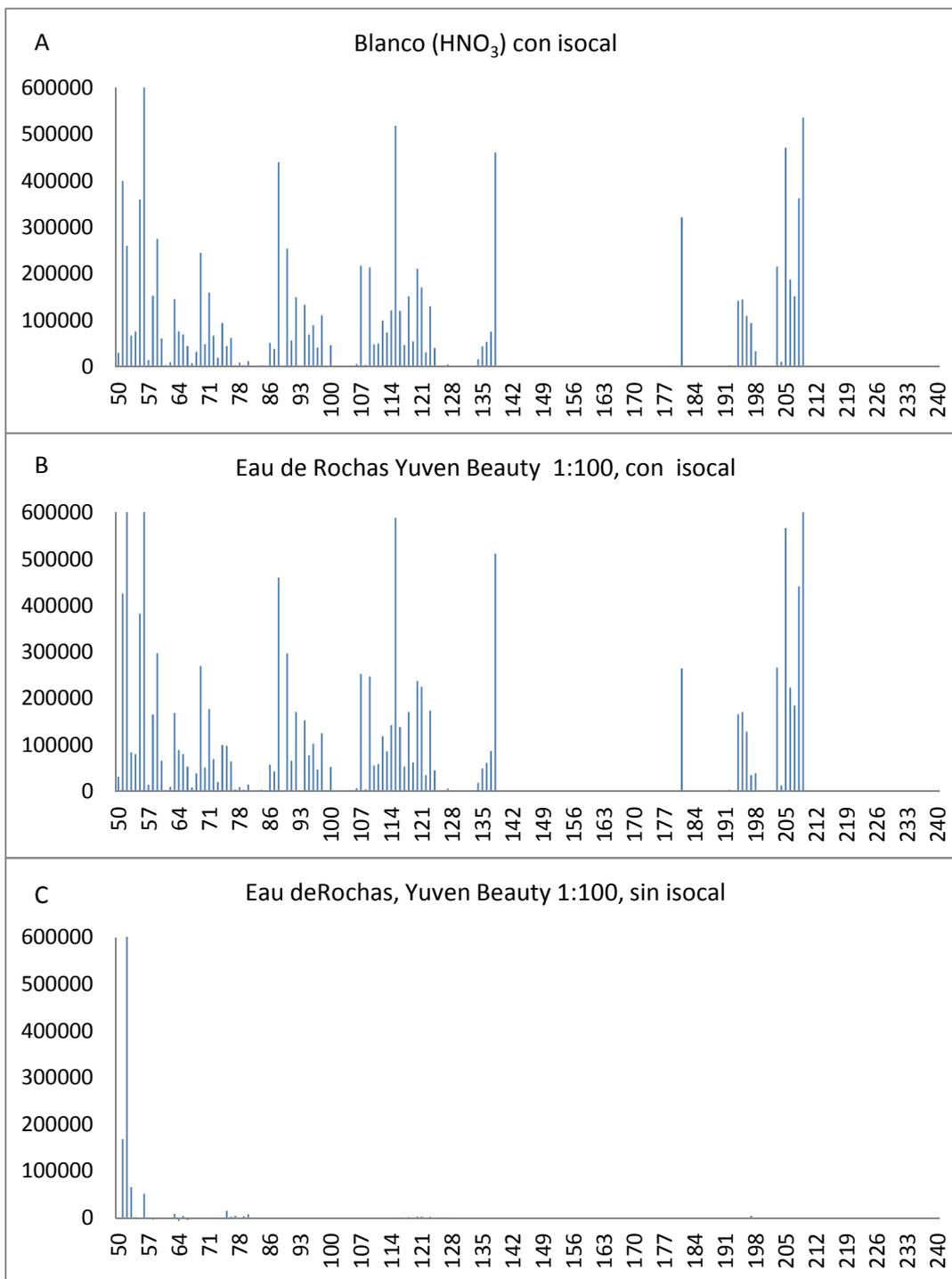


Figura 3. Espectros de masas de (A) HNO₃ dopado con Isocal (blanco), (B) muestra Eau de Rochas dopada con Isocal en dilución 1:100 y (C) muestra Eau de Rochas en dilución 1:100.

Como se aprecia en los espectros (figura 3) la recuperación del isocal es del 100%. Este mismo estudio de recuperación fue realizado con los otros dos métodos de preparación de muestra (dilución con mezcla de ácidos y evaporación-reconstitución) con la obtención de idénticos resultados.

Por tanto se puede concluir que las diluciones son un método perfectamente válido para la preparación de los perfumes. Las condiciones quedarían finalmente en dilución 1:20 en HNO₃ más etapa de lixiviación de 15min bajo ultrasonidos.

4.2. Estudios previos

Ahora que se ha seleccionado la preparación de muestra se mirará con más detalle el contenido metálico presente en los perfumes, y se tendrá especial interés en las posibles diferencias entre las marcas originales y las imitaciones en relación a esos componentes metálicos.

Se dispuso de seis muestras de perfume (tabla 8), que fueron analizadas de forma multielemental en todo el rango de masas. Para este análisis el perfume fue diluido 1:20 con HNO₃ al 1%. seguido de 15 minutos de lixiviación en un baño de ultrasonidos, y finalmente analizado en el equipo ICP-MS Agilent 7500ce.

Chanel No5
Chanel Yuven Beauty
Chanel Saphir Lab.
Eau de Rochas
Rochas Yuven Beauty
Rochas Saphir Lab.

Tabla 8. Muestras utilizadas.

Los espectros obtenidos (figura 4) para los perfumes, tanto originales como imitaciones, muestran pocos elementos metálicos y aún menos diferencias entre ellos salvo los listados en la siguiente tabla:

Elementos	Chanel N°5		Eau de Rochas	
	Yuven Beauty	Saphir Lab.	Yuven Beauty	Saphir Lab.
Cr	=	=	=	=
Fe	=	=	=	=
Se	=	=	=	=
Br	=	=	=	=
I	=	=	=	=
Ba	-	-	-	-
Sr	-	-	-	-
Rb	-	-	-	-
Zn	+	-	+	-
As	-	-	-	-

Tabla 9. Diferencias en elementos metálicos entre las imitaciones y las marcas originales.

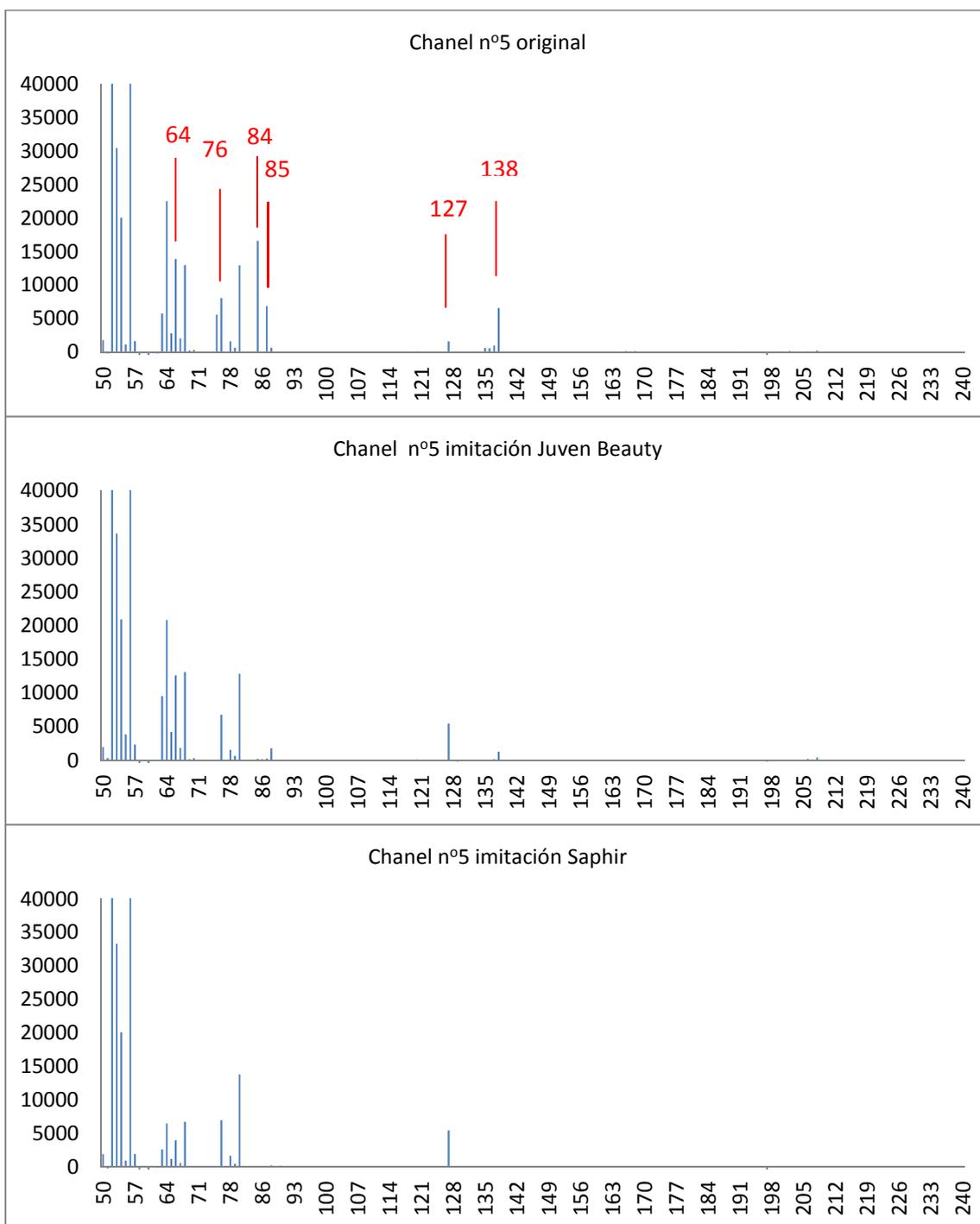


Figura 4. Espectro de masas de (A) perfume de Chanel N°5 original, (B) Chanel imitación de Yuven Beauty y (C) Chanel de imitación Saphir Laboratorios. Se resalta en rojo las diferencias entre el perfume original y las imitaciones.

4.3. Selección del trazador

Idealmente, con el objeto de modificar la composición de los perfumes lo menos posible, el elemento trazador debería encontrarse en la muestra. Sin embargo en el estudio previo realizado anteriormente se demostró que los perfumes solo tienen unos pocos elementos metálicos (tabla 5). Debido a que un elemento necesita al menos tres isótopos estables para ser utilizado como trazador, se elimina la posibilidad de utilizar Rubidio, Bromo, Iodo y Arsénico. Otros como el Bario, Cromo y Zinc se encuentran prohibidos por la legislación y finalmente el Hierro y Estroncio sufren de serias interferencias que desaconsejan su uso.

Puesto que ninguno de los elementos metálicos presentes originariamente en los perfumes sirve como trazador, se decidió la incorporación de un elemento externo que situado dentro de la normativa vigente cumpla las características necesarias de un trazador. Ante esta situación, y tras evaluar diferentes metales, se llegó a la elección de Molibdeno. Este elemento [31] que posee hasta siete isótopos estables diferentes (tabla 9) no está presente en los listados emitidos por la directiva cosmética y por tanto no está prohibido. Se trata además de un elemento esencial, componente de suplemento vitamínico, usado en prótesis corporales sin toxicidad conocida. Estas aplicaciones animaron a la elección de este elemento.

Isótopo	Abundancia natural (%)
92	14.84
94	9.25
95	15.92
96	16.68
97	9.55
98	24.13
100	9.63

Tabla 10. Abundancia natural de los isótopos de molibdeno.

4.4. Optimización de la concentración del spike

Por estudios previos realizados en el ICP-MS 7500 se conoce que una concentración óptima de trazador en el equipo para su correcta detección son 15ppb. Ésto, teniendo en cuenta el método de preparación de muestra (dilución 1:20) se corresponde con un marcaje de 300ppb. Sin embargo resulta interesante conocer si concentraciones inferiores pueden usarse, tanto por el ahorro de trazador como por la menor modificación de las muestras. Para ello se prepara un spike en relación isotópica 1:1 (0.911 experimental), y muestras de perfumes de imitación son marcados en diferentes concentraciones (tabla 11).

Muestras	Concentraciones spike (ppb)			
Chanel Yuben Beauty	300	150	75	25
Rochas Yuben Beauty				

Tabla 11. Muestras y concentraciones de Spike utilizadas en la optimización de la concentración de spike.

Los resultados muestran que la marca introducida en los perfumes (0.911) se recupera en todas las muestras, independientemente de la concentración de spike utilizado (figura 5).

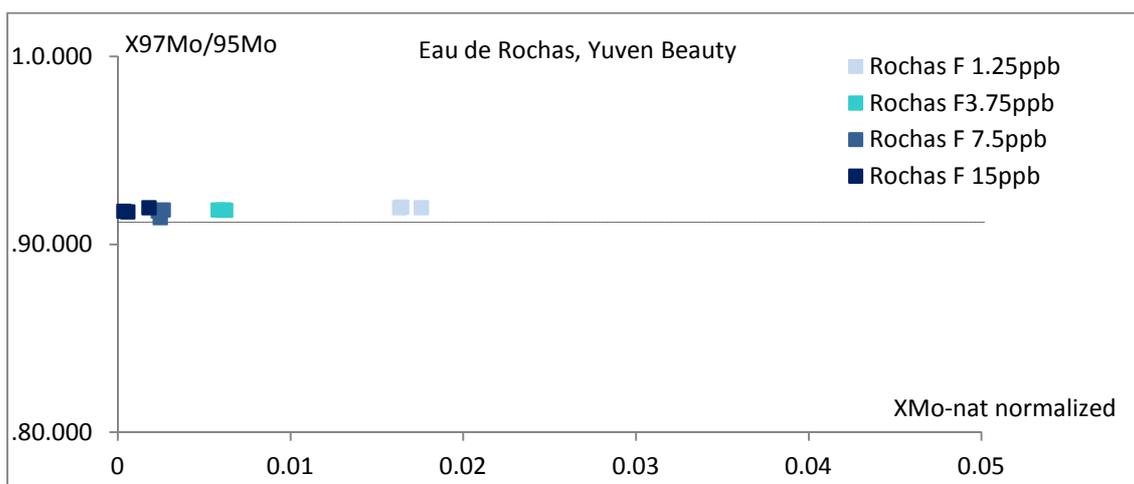


Fig. 5. Relaciones isotópicas experimentales obtenidas para diferentes concentraciones de spike en una muestra de Eau de Rochas (imitación de Yuben Beauty).

Sin embargo atendiendo a la incertidumbre asociada a la medida de la relación isotópica (figura 6) se aprecia un aumento de la incertidumbre al disminuir la concentración de spike. Ésto por otro lado es esperable, pues a menor cantidad de trazador más dificultad se presenta para su detección en el equipo. También es apreciable el aumento de la dispersión de las incertidumbres a menor concentración.

La similitud en incertidumbre y dispersión para marcajes de 300 y 150ppb, hacen que la elección de 150ppb como concentración de marcaje sea adecuada.

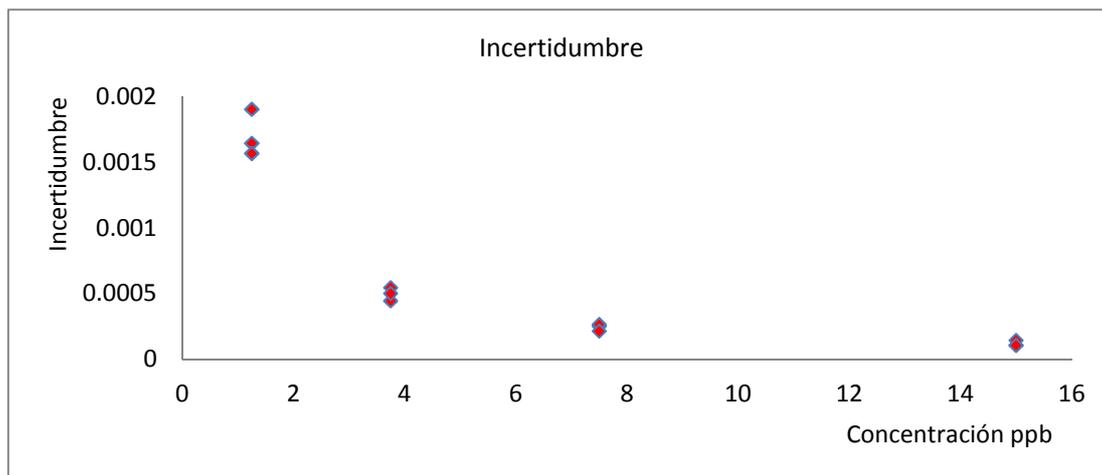


Figura 6. Incertidumbre de la medida de la relación isotópica para diferentes concentraciones de spike.

4.5. Optimización de diferentes relaciones isotópicas

Para aumentar las posibilidades de este método de marcaje, otras relaciones isotópicas son preparadas para comprobar si son susceptibles de ser utilizadas. Se elaboran tres spikes diferentes (tabla 12), y muestras de Chanel y Rochas imitación Yuben Beauty son marcadas con dichos spikes, en la concentración elegida en el apartado anterior (150ppb).

$^{97}\text{Mo}/^{95}\text{Mo}$	Teórico	Experimental	Incertidumbre
1:1	1.000	0.911	3.98×10^{-5}
1:3	0.333	0.321	0.0002
3:1	3.000	2.642	0.0003

Tabla 12 - spikes preparados con su valor teórico, el medido experimentalmente y la incertidumbre de la medida.

En la siguiente tabla se recogen los datos obtenidos para las medidas de los diferentes spikes en las diferentes muestras (tabla 13).

En la representación de estos datos (figura 7) se comprueban como las marcas introducidas en las muestras se recuperan independientemente de la relación isotópica utilizada. No obstante la relación 3:1 parece ser algo menos estable con incertidumbres un rango de magnitud más elevadas y mayor desviación y variabilidad de los datos experimentales frente a los teóricos.

	Spikes	Eau de Rochas		Chanel N°5	
Relación	Relación experimental	Relación Experimental	Incertidumbre	Relación Experimental	Incertidumbre
1:1	0.911	0.919	0.00010	0.919	0.00037
1:1		0.917	0.00011	0.919	0.00028
1:1		0.919	0.00014	0.918	0.00020
1:3	0.321	0.321	0.00018	0.318	0.00018
1:3		0.322	0.00011	0.322	0.00015
1:3		0.321	0.00012	0.323	0.00010
3:1	2.642	2.676	0.0029	2.628	0.0027
3:1		2.677	0.0023	2.651	0.0027
3:1		2.686	0.0025	2.654	0.0020

Tabla 13 - Resultados obtenidos en la optimización de la relación isotópica.

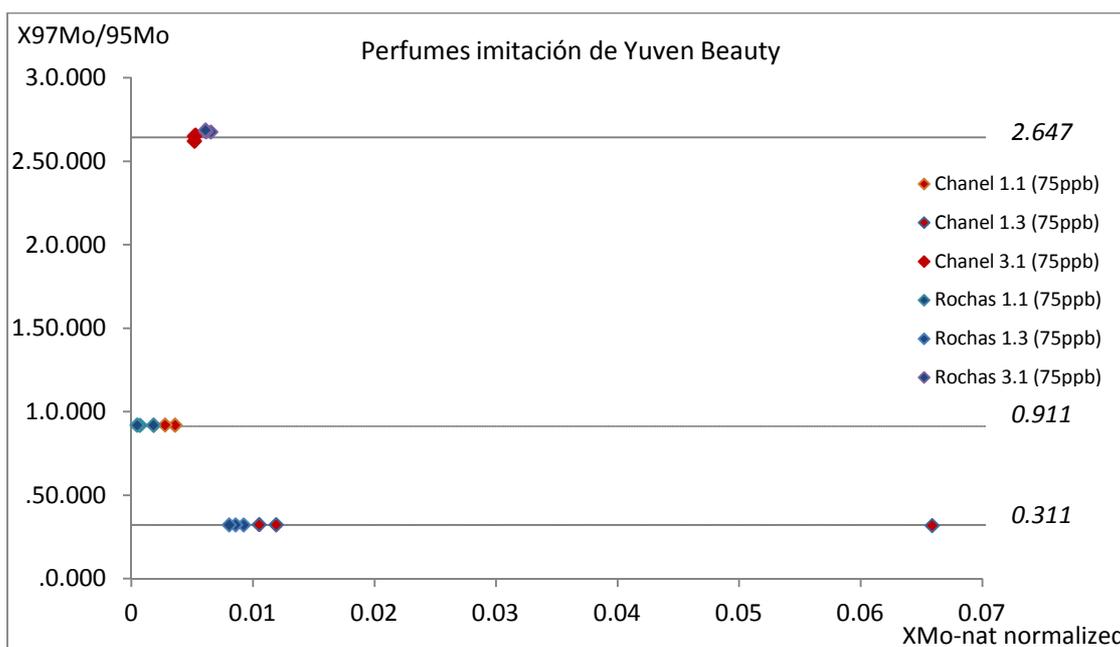


Figura 7. Representación de diferentes relaciones isotópicas medidas en perfumes Chanel y Eau de Rochas imitación de Yuen Beauty.

4.6 Marcaje de perfumes originales

Una vez que se ha ajustado la preparación de muestra, la concentración de spike óptima para una correcta detección en el equipo ICP-MS, y comprobado que diferentes relaciones isotópicas son posibles se procede al marcaje de perfumes originales (tabla 14)

Perfumes	Dilución	Concentración	Relación isotópica
Chanel N°5	1:20	150ppb	1:1
Eau de Rochas			

Tabla 14. Muestras y condiciones del marcaje de perfumes originales.

A pesar que la matriz de éstos pueda ser más compleja que la de las imitaciones utilizadas en las optimizaciones anteriores, se espera que no sea motivo para la no obtención de resultados satisfactorios. Sin embargo diferencias en la matriz hacen que la dilución utilizada no sea adecuada, obteniendo una incertidumbre un grado de magnitud más elevada que las imitaciones. Al mismo tiempo las muestras presentan una textura viscosa que lleva a pensar posibles errores debido a la introducción al equipo así como inestabilidades en el plasma. Ante este contratiempo se procedió a utilizar una nueva dilución, 1:40 que afortunadamente obtuvo mejores resultados, más acordes a los obtenidos con las imitaciones (tabla 15).

Perfume	Imitaciones 1:20	Originales 1:20	Originales 1:40
Chanel	0.00026	0.00107	0.00050
Chanel	0.00019	0.00111	0.00026
Chanel	0.00027	0.00112	0.00045
Rochas	0.00025	0.00891	0.00058
Rochas	0.00026	0.00900	0.00075
Rochas	0.00021	0.00799	0.00058

Tabla 15. Comparación de las incertidumbres correspondientes a las medidas de las muestras originales y las imitaciones.

De igual modo a lo obtenido para las muestras de perfume de imitación, las relaciones isotópicas para la dilución 1:40 ofreció resultados satisfactorios, recuperándose la marca introducida en todas las muestras analizadas (figura 8).

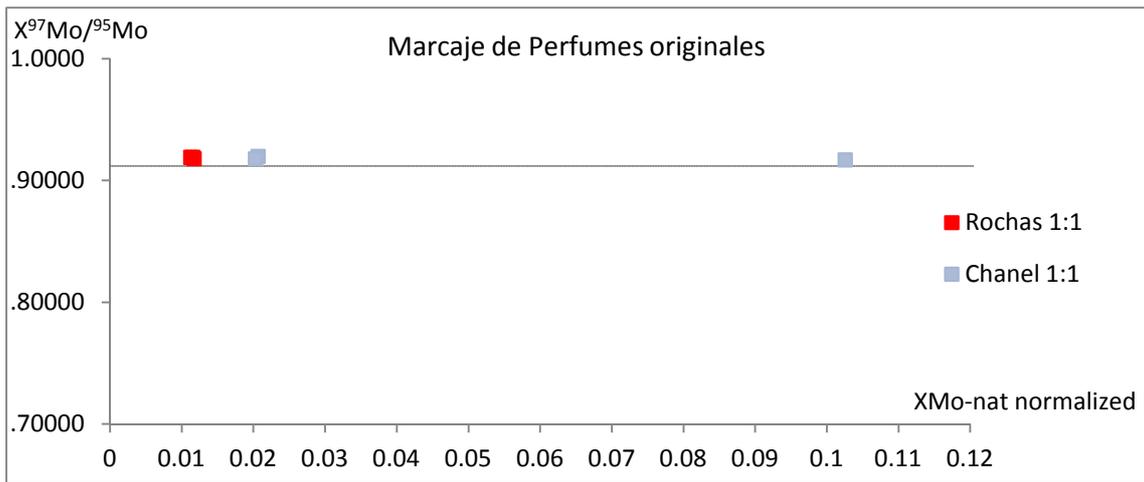


Figura 8. Relaciones isotópicas medidas en los perfumes originales de Eau de Rochas y Chanel N°5 para una dilución 1:40.

5.- Conclusiones

Las conclusiones de este trabajo son:

- 1.- Los perfumes carecen prácticamente de contenido metálico y tan solo unos pocos elementos diferencian los originales de las imitaciones. Por tanto se hace necesario la adición de un elemento no presente en la matriz de la muestra para desarrollar un marcaje encubierto.
- 2.- El procedimiento de preparación de muestra consistente en dilución con HNO₃ 1% (v/v) y lixiviación en un baño de ultrasonidos aplicado a bebidas alcohólicas es también válido a la extracción de metales en perfumes.
- 3.- Los perfumes originales definitivamente poseen una matriz más compleja que la de sus diferentes imitaciones y/o falsificaciones.
- 3.- La mezcla 1:1 y 1:3 son más favorables que la 3:1 que posee mayor incertidumbre y mayor desviación entre el valor experimental y el teórico.
- 4.- El proceso de marcaje isotópico es estable, recuperándose la marca introducida en las muestras.

Este método de marcaje desarrollado busca para la diferenciación de perfumes originales de sus imitaciones y falsificaciones. Está basado en la medida de la relación isotópica $^{97}\text{Mo}/^{95}\text{Mo}$ mediante un equipo de ICP-MS. Las posibilidades de este tipo marcaje son variadas, pudiendo desarrollar diferentes marcas aplicables a diferentes productos o lotes de productos. Las posibilidades ofrecidas respecto a la elección del elemento trazador, de los isótopos o de la relación isotópica reducen la posibilidad de fraude de forma notable.

7.- Bibliografía

- 1.- C. Bicchi, P. Rubiolo, C. Cordero, "Separation science in perfume analysis", *Anal. Bioanal. Chem*, 384, 53-56, 2006.
- 2.- Arian Van Asten, "The importance of GC and GC-MS in Perfume analysis", *TrAC trends in Analytical Chemistry*, 21 (9,10), 698-708, 2002.
- 3.- R. Haddad, RR. Catharino, LA. Marques, "Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization MS: nearly instantaneous typification and counterfeit detection", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22(22), 3662-3666, 2008.
- 4.- LA. Marques, RR. Catharino, RE. Bruns, "Electrospray ionization MS fingerprinting of perfumes: rapid classification and counterfeit detection", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20(24), 3654-3658, 2006.
- 5.- K. Chingin, G. Gamez, H. Chen, "Rapid classification of perfumes by extractive electrospray ionization mass spectrometry (EESI-MS)", *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22 (13), 2009-2014, 2008.
- 6.- M. Cano, V. Borrego, J. Roales, "Rapid discrimination and counterfeit detection of perfumes by an electronic olfactory system", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156, 319-324, 2011.
- 7.- MJ. Zirwas, M. Bechtel, "Allergic contact dermatitis to a perfume containing lylal", *J. AM. ACAD. DERMATOL.*, 85 (5), 97-98, 2008.
- 8.- A. Pons-Guiraud, "Les Alergies aux Parfumes", *Revue Française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 47, 232-236, 2007.
- 9.- Council Directive of 26 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products, 76/768/EEC,
10. – Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, *Official Journal of the European Union* 22/12/2009
- 11.- *Economic Impact of Counterfeiting and Piracy – OECD*
- 12.- 6.- Peggy Chaudhry, Alan Zimmerman, "The Economics of Counterfeit Trade", Springer, 2009.
- 13.- Richard P. Welle, "Isotopic taggant method and composition", patente W09743751.
- 14.- Jean-Pierre Frideling, "Procédé de marquage isotopique de produits et ses applications á la lutte contre la contrefaçon", patente EP 1677105

- 15.- José I. García Alonso, "Método para el marcaje e identificación de objetos manufacturados, sustancias y organismos, y sus usos", patente 2320085.
- 16.- I. Carames-Pasaron, J.A.Rodríguez-Castrillón, J. I. García Alonso, "Developement of a Dual-Isotope Procedure for the Tagging and Identification of Manufactured Products: Application to explosives", *Anal. Chem*, 84, 12-126, 2012.
- 17.- G. Huelga-Suárez, A. García-Valiente, E. García-Vázquez, "Individual-Specific transgenerational Marking of Fish Populations based on a Barium Dual Isotope Procedure", *Anal. Chem*, 84, 127-133, 2012.
- 18.- Andres R. Munro, Bronwyn M. Gillanders, "Enriched stable isotopes marking of juvenile golden perch (*Macquaria ambigua*) otoliths", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65(2), 276-285. 2008.
- 19.- B. Medina, S. Augagneur, "Influence of atmospheric pollution on the lead content of wines", *Food Add. Contam*, 17 (6), 435-445, 2000.
- 20.- M. J. Baxter, Helen M. Crews, "The determination of the authenticity of wine from its trace element composition", *Food Chemistry*, 60 (3), 443-450, 1997.
- 21.- V. F. Taylor, Henry P. Longerich, "Multielement Analysis of Canadian Wines by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) and Multivariate Statistics", *J. Agric. Food Chem*, 51, 856-860, 2003.
- 22.- Krystyna Pyrzyńska, "Analytical Methods for the Determination of Trace Metals in Wine", *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 43, 69-83, 2004.
- 23.- Julia Barciela, Manuel Vilar, Sagrario García-Martín, "Study on different pre-treatment procedures for metal determination in Orujo Spirit samples by ICP-AES", *Analytica Chimica Acta*, 628, 33-40, 2008.
- 24.- Ilia Roduschkin, Fredrik Ödman, Petra K. Appelblad, "Multielement Determination and Lead Isotope Ratio Measurement in Alcoholic Beverages by High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry", *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 243-257, 1999.
- 25.- Trace elements analysis of distilled alcoholic beverages using the Agilent 7700x ICP-MS with octapole collision/reaction cell. *Agilent Technologies*, Agilent.com/chem.
- 26.- Greenough et al., "Trace element concentrations in wines by ICP-MS: evidence for the role of solubility in determining uptake by plants", *Can. J. Appl. Spectr.* 41, 76-80, 1996.
- 27.- M. M. Castiñeira, R. Brandt, N. Jakubowski, "Developement of a procedure for the multi element determination of trace elements in wine by ICP-MS", *Fresenius J Anal. Chem*, 370, 553-558, 2001.
- 28.- C. Marisa, R. Almeida, M. Teresa S. D. Vasconcelos, "UV-irradiation and MW-digestion pre-treatment of Port wine suitable for the determination of lead isotope ratios by inductively coupled plasma mass spectrometry", *J. Anal. atom. Spectrom.* 14, 1815, 1999.

29.- Luis C. Alves, Michael G. Minnich, Daniel R. Wiederin, "Removal of organic solvents by cryogenic desolvation in inductively coupled plasma mass spectrometry", *J. Anal. At. Spectrom*, 9, 399-403, 1994.

30.- D. S. Lowe, R. G. Stahl, "Determination of Trace elements in organic solvents by Inductively Coupled Plasma Mass Spectromery", *Anal. Proc*, 29, 277, 1992.

31.- Donald G. Barceloux, "Molybdenum", *Journal of Toxicology-clinical Toxicology*, 37 (2), 231-237, 1999.

